TEST AMPLIFIED POUR LA DETECTION DIRECTE DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Coffret de 50 tests
(bioMérieux Best.Nr. 39006 / Hologic Kat. Nr. 301001F)

UTILISATION **2**
AVERTISSEMENT **2**
PRÉCAUTIONS D'UTILISATION **2**
INTRODUCTION **4**
PRINCIPE **5**
RÉACTIFS (Coffret de 50 tests) **5**
CONSERVATION **6**
PRELEVEMENT, CONSERVATION, TRANSPORT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS **7**
- **Prélèvement et conservation de l'échantillon :** **7**
- **Transport** **7**
- **Traitement (décontamination et concentration)** **7**
- **Stockage des échantillons traités** **7**

MATÉRIEL **7**
MODE OPERATOIRE **9**
- **Contrôles** **9**
- **Préparation du matériel** **11**
- **Préparation du réactif** **12**
- **Préparation des échantillons** **12**
- **Lyse des échantillons** **13**
- **Amplification** **13**
- **Hybridation** **14**
- **Sélection** **15**
- **Détection** **15**
- **Répétition du test** **15**

REMARQUES **16**
INTERPRETATION OU TEST **17**
PRESENTATION DES RESULTATS **18**
LIMITES **18**
VALEURS ATTENDUES **19**
PERFORMANCES **19**
RESOLUTION D'INCIDENTS **23**
NOTES **25**
BIBLIOGRAPHIE **26**

UTILISATION

Le test Hologic AMPLIFIED POUR LA DETECTION DIRECTE DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTD) est un test utilisant une sonde d'acide nucléique dirigée contre une cible amplifiée permettant la détection *in vitro* des acides nucléiques des mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Ce test est réalisé à partir d'échantillons provenant de crachats (induits ou expectorés), de prélèvements bronchiques (lavages broncho-alvéolaires ou aspirations bronchiques) ou d'aspirations trachéales.

AVERTISSEMENT

L'efficacité de ce test n'a pas encore été démontrée pour la détection directe d'ARNr de *M. tuberculosis* à partir d'autres échantillons cliniques (sanguins, urinaires ou coprologiques par exemple). Les performances du test MTD n'ont été étudiées que pour des échantillons traités selon la technique décrite et conservés pour des durées et aux températures spécifiées dans la présente notice.

Les échantillons donnant des résultats positifs doivent être mis en culture pour déterminer la présence éventuelle de mycobactéries autres que celles du complexe *M. tuberculosis* ou mycobactéries atypiques. Des tests de sensibilité aux agents anti-mycobactériens doivent également être effectués. Des cultures pour la recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) doivent être réalisées afin de préciser quelle sousespèce du complexe *M. tuberculosis* (*M. bovis*, par exemple) est présente.

Au cours des essais cliniques, des prélèvements réalisés sur des enfants, des patients VIH-positifs et des patients infectés par des mycobactéries atypiques ont été soumis au test. Toutefois, le nombre de ces essais n'a pas permis de comparer statistiquement les performances du test pour ces différents groupes.

Les performances du test sur des prélèvements provenant de patients sous traitement anti-tuberculeux, dans le but de réaliser un suivi thérapeutique ou de confirmer une guérison, n'ont pas été évaluées.

Les échantillons à forte concentration sanguine ne doivent pas être testés avec le coffret MTD.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

A. A usage diagnostic *in vitro* seulement.

B. Le test MTD est spécifique des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, à savoir *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum, M. microti*, et *M.canetti*, mais ne différencie pas ces espèces entre elles. *M. celatum* et *M. terrae*-like peuvent provoquer des réactions croisées s'ils sont présents à des concentrations supérieures à 30 UFC (Unités Formant Colonie) par test. Toutefois *M. celatum* et *M. terrae*-like sont rarement isolées en clinique.

C. Un résultat négatif n'exclut pas la présence d'une mycobactérie du complexe *M. tuberculosis* dans l'échantillon. La qualité des résultats est liée à la qualité du prélèvement et de son transport, à la variabilité de la prise d'échantillons, aux erreurs

techniques du laboratoire, aux erreurs d'identification des échantillons et aux erreurs de transcription des résultats.

D. Le test est réservé à la détection des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, à partir d'échantillons préparés selon les méthodes NALC-NaOH ou NaOH qui sont recommandées par les Centers for Disease Control (CDC)[7]. Ce test doit être utilisé uniquement pour des échantillons concentrés préparés à partir de crachats (induits ou expectorés), d'aspirations trachéales ou de prélèvements bronchiques (lavages bron-cho-alvéolaires ou aspirations bronchiques). Lors de la remise en suspension de l'échantillon dans la solution de tampon phosphate, vérifier que la concentration de phosphate soit de 67 mM[7].

E. Eviter tout contact des Réactifs de Détection I et II (bioMérieux réf. 39300 / Cat. No. 201791) avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant d'essuyer.

F. Prendre les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test[4]. La préparation des échantillons digérés et décontaminés ainsi que les étapes du test MTD doivent être réalisées en respectant les règles de sécurité microbiologique de niveau 2[5].

G. N'utiliser que le matériel fourni ou du matériel de laboratoire à usage unique.

H. Les paillasses, les pipettes et le matériel doivent être décontaminés avec une solution d'eau de Javel diluée au 1 / 2 (moitié eau de Javel, moitié eau), comme décrit dans le paragraphe « MODE OPERATOIRE ». Laisser l'eau de Javel en contact pendant 15 minutes, puis rincer à l'eau et essuyer pour éliminer les traces d'eau de Javel.

I. Des pipettes à déplacement positif ou des pipettes à déplacement d'air équipées de pointes munies d'un filtre doivent être utilisées pour réaliser ce test. Lors du transfert du lysat des tubes de lyse aux tubes d'amplification, des pointes extra-longues doivent être utilisées. Changer de pointe entre chaque étape. Eviter de passer au-dessus des autres tubes du portoir. Les pointes usagées doivent être immédiatement jetées dans un récipient destiné aux déchets biologiques.

J. Lors de l'utilisation d'une pipette répétitive pour la distribution des réactifs, après l'introduction du lysat dans les tubes, éviter de toucher le tube avec la pointe de la pipette afin de réduire les risques de contamination entre tubes. Les réactifs doivent être distribués contre la paroi du tube afin d'éviter les projections. Le soin apporté à la distribution des réactifs permettra de réduire les risques de contamination croisée.

K. Ne pas utiliser les mêmes pipettes pour les étapes précédant l'amplification et les étapes suivant l'amplification.

L. Après la lecture des résultats à l'aide du luminomètre, décontaminer les tubes et les jeter comme décrit dans les paragraphes « MODE OPERATOIRE » et « REMARQUES » afin d'éviter la contamination du laboratoire par les amplicons.

M. Ne JAMAIS réutiliser les feuilles autocollantes et les bouchons utilisés au cours d'une précédente étape. Les bouchons doivent être jetés dans un récipient approprié immédiatement après leur retrait pour éviter toute contamination croisée. Les feuilles autocollantes doivent être fermement appliquées sur le haut des tubes réactionnels.

N. Ne pas couvrir le bain-marie pendant les incubations, particulièrement si des bouchons sont utilisés (la condensation sur le couvercle peut être une source de contamination).

O. Une bonne homogénéisation à l'aide d'un Vortex est nécessaire après l'addition du Réactif de Sélection pour obtenir des résultats précis.

P. Il est recommandé de sélectionner un endroit pour l'étape HPA (Hybridization Protection Assay) pour minimiser la contamination par les amplicons. Cet endroit doit être différent de celui des préparations des échantillons et des réactifs et de l'étape d'amplification.

Q. Pour prévenir les contaminations par amplicons au laboratoire, les emplacements doivent être organisés pour un travail à sens uni-directionnel. Par example, procéder à la préparation des échantillons et des réactifs puis à l'étape d'amplification et ensuite passer à l'étape HPA. Les échantillons, le matériel et les réactifs ne doivent pas retourner dans les endroits ou a eu lieu l'étape précédente. De même le personnel ne doit pas retourner dans les aires de travail sans des précautions d'anticontamination. Il est fortement recommandé que la hotte utilisée pour la préparation des échantillons ne soit pas utiliser pour réaliser le test MTD.

INTRODUCTION

Le test MTD utilise les méthodes TMA (Transcription-Mediated Amplification) et HPA (Hybridization Protection Assay)[2] pour détecter qualitativement l'ARN ribosomal (ARNr) des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*. Le test MTD détecte l'ARN des organismes cultivables et non cultivables. Le complexe *M. tuberculosis* comprend les sous-espèces *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, et *M. canetti*[12, 13]. Le test MTD détecte tous les microorganismes du complexe *M. tuberculosis*. Toutefois, *M. microti* n'infecte que les animaux, *M. bovis* est rarement transmis des animaux infectés aux humains. *M. africanum*, quant à lui, est responsable de tuberculose pulmonaire en Afrique tropicale[12]. *M. tuberculosis* est de loin le membre le plus commun, responsable d'une morbidité importante dans le monde entier. Le CDC a récemment fait état d'une augmentation des cas de tuberculose chez les patients atteints de SIDA et les immigrés, et d'une augmentation de la transmission de la maladie au sein des populations à haut risque[6,9]. On observe également l'augmentation du nombre de souches résistantes, voire multi-résistantes aux anti-tuberculeux[11]. Les conséquences sont considérables dans le domaine de la santé publique.

Les méthodes de culture conventionnelles permettent d'observer la croissance de *M. tuberculosis* dans un délai de 1 à 8 semaines[7,10]. Le test MTD, quant à lui, permet la détection de l'ARNr des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* en 2,5 à 3,5 heures. Bien qu'il ne permette pas de réaliser d'antibiogramme, le test MTD détecte *M. tuberculosis* de manière fiable et rapide. Ceci permet d'utiliser au mieux les services d'isolement des hôpitaux, de débuter rapidement un traitement approprié et de prévenir la propagation de la maladie grâce à l'identification précoce et l'isolement des individus contaminés[3].

PRINCIPE

Le test MTD est un test en deux phases (l'amplification et la détection) qui sont réalisées dans un même tube. Tout d'abord, la sonication provoque la libération des acides nucléiques des mycobactéries. La chaleur est utilisée pour dénaturer ces acides nucléiques et rompre la structure secondaire de l'ARNr. La méthode d'amplification TMA amplifie ensuite une cible spécifique d'ARNr mycobactérien via un intermédiaire d'ADN, à une température constante de 42°C. De multiples copies de l'ARNr mycobactérien (amplicons) sont ainsi produites.

Les séquences de l'amplicon d'ARNr, spécifiques des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, sont ensuite détectées grâce à la méthode d'hybridation d'acides nucléiques HPA[2]. Le Réactif d'Hybridation du test MTD contient une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimiluminescent. Cette sonde est complémentaire des séquences d'ARN spécifiques des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*. La sonde forme avec ces séquences spécifiques des hybrides stables ARN:ADN. Après l'étape de sélection, le signal lumineux émis par les sondes hybridées est mesuré à l'aide du luminomètre Leader™.

RÉACTIFS (Coffret de 50 tests)

Remarque : *Pour obtenir des informations sur les mentions de danger et de mise en garde qui pourraient être associées à ces réactifs, consultez la Safety Data Sheet Library (Bibliothèque des fiches techniques de sécurité) à l'adresse www.hologic.com/sds.*

Les réactifs pour le test MTD sont fournis comme suit :

PRESENTOIR DES RÉACTIFS POUR AMPLIFICATION

Nom du réactif	Volume
Tampon de Dilution des Echantillons (SDB) *Solution tampon Tris contenant < 3% de détergent*	1 x 2,5 ml
Réactif d'Amplification (A) *Acides nucléiques lyophilisés dans une solution tampon Tris contenant 5% d'agent liant*	1 x 3 ml (après reconstitution)
Tampon d'amplification (AB) *Solution aqueuse contenant des conservateurs*	1 x 3 ml
Réactif d'amplification huileux (huile pour réaction d'amplification) (0) *Huile silicone*	1 x 10 ml
Réactif Enzymatique (E) *Transcriptase inverse et ARN polymérase lyophilisées dans une solution tampon HEPES contenant < 10 % d'agent liant et ≥ 15 mM de N-Acétyl-L-Cystéine*	1 x 1,5 ml (après reconstitution)
Tampon de Dilution Enzymatique (tampon de dilution des enzymes) (EDB) *Solution tampon Tris contenant un surfactant et du glycérol*	1 x 1,5 ml

PRESENTOIR DES RÉACTIFS POUR HYBRIDATION

Nom du réactif	Volume
Réactif d'Hybridation (H) *< 100 ng/flacon de sonde ADN non infectieuse conjuguée à un marqueur chimiluminescent, lyophilisée, dans une solution tampon succinate contenant un agent liant et un détergent*	1 x 6 ml (après reconstitution)
Tampon d'Hybridation (HB) *Solution tampon succinate contenant < 4% de détergent*	1 x 6 ml
Réactif de Sélection (S) *Solution tampon borate contenant un surfactant*	1 x 15 ml
Tubes de Lyse (LT) *Billes de verre, agent liant*	2 x 25 tubes

CONSERVATION

A. Les solutions ou les composants non reconstitués suivants doivent être conservés à 2°C - 8°C et sont utilisables jusqu'à la date de péremption indiquée :

- Tampon de Dilution des Echantillons (SDB)
- Réactif d'Amplification (A)
- Tampon d'Amplification (AB)
- Réactif Enzymatique (E)
- Tampon de Dilution Enzymatique (EDB)
- Réactif d'Hybridation (H)

Le Réactif d'Amplification *reconstitué* (A) est utilisable pendant 2 mois s'il est conservé à 2°C - 8°C. Le Réactif d'Hybridation (H) et le Réactif Enzymatique (E) sont utilisables un mois à 2°C - 8°C après reconstitution, ou deux mois à une température égale ou inférieure à
-20°C s'ils sont aliquotés et congelés le jour de leur reconstitution. Les fractions aliquotes congelées doivent être utilisées le jour où elles sont décongelées. Ne pas utiliser de congélateur à dégivrage automatique.

B. Les composants suivants doivent être conservés entre 2°C et 25°C et sont utilisables jusqu'à la date de péremption indiquée :

- Réactif d'amplification huileux (0)
- Tampon d'Hybridation (HB)
- Réactif de Sélection (S)
- Tubes de Lyse (LT)

PRELEVEMENT, CONSERVATION, TRANSPORT ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Prélèvement et conservation de l'échantillon :

Les échantillons doivent être placés dans des récipients en plastique stériles et conservés à 2°C - 8°C avant leur transport et leur traitement. Au cours des essais cliniques, les échantillons ont été stockés moins de 4 jours (généralement moins de 24 heures) avant leur traitement.

Transport

Transporter les échantillons au laboratoire le plus rapidement possible conformément aux réglementations en vigueur.

Traitement (décontamination et concentration)

Les échantillons à forte concentration sanguine ne doivent pas être soumis au test MTD. Ce test est conçu pour détecter l'ARNr des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* en utilisant des échantillons préparés selon les méthodes de décontamination NALC-NaOH ou NaOH utilisant 1% à 1,5% de NaOH pendant 15 à 20 minutes et une centrifugation à une vitesse supérieure ou égale à ≥ 3,000 g[7].

Stockage des échantillons traités

Les échantillons peuvent être stockés au maximum 3 jours à 2°C - 8°C avant le test. Ils peuvent également être stockés entre -20°C et -70°C pendant 6 mois au plus. Ne pas utiliser de congélateur à dégivrage automatique.

MATÉRIEL

A. Matériel fourni

PRESENTOIR DES RÉACTIFS POUR AMPLIFICATION

Composition du coffret *(bioMérieux réf. 39006 / Hologic Cat. No. 301001F)*	**50 Tests**
Tampon de Dilution des Echantillons (SDB)	1 x 2,5 ml
Réactif d'Amplification (A)	1 x 3 ml (après reconstitution)
Tampon de Reconstitution (AB)	1 x 3 ml
Réactif huileux (huile pour réaction d'amplification) (O)	1 x 10 ml
Réactif Enzymatique (E)	1 x 1,5 ml (après reconstitution)
Tampon de Dilution Enzymatique (EDB)	1 x 1,5 ml

PRESENTOIR DES RÉACTIFS POUR HYBRIDATION

Composition du coffret *(bioMérieux réf. 39006 / Hologic Cat. No. 301001F)*	**50 Tests**
Réactif d'Hybridation (H)	1 x 6 ml (après reconstitution)
Tampon d'Hybridation (HB)	1 x 6 ml
Réactif de Sélection (S)	1 x 15 ml
Tubes de Lyse (LT)	2 x 25 tubes
Cartes de protection (feuilles autocollantes)	1 paquet

B. Matériel nécessaire non fourni :

- Micropipettes capables de distribuer 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl et 450 µl
- Vortex
- Eau stérile (filtrée ou autoclavée)
- Tubes de culture
- Billes de verre stériles de 3 mm
- Tubes pour microcentrifugeuse avec bouchons à vis
- Portoir pour tubes réactionnels
- Pointes de pipette munies d'un filtre (1000 µl)
- Témoins Positifs d'Amplification (par ex. *M. tuberculosis*, ATCC 25177 ou ATCC 27294)
- Témoins Négatifs d'Amplification (par ex. *M. gordonae*, ATCC 14470 ou *M. terrae*, ATCC 15755)
- Eau de Javel (solution d'hypochlorite à 5,25%)
- Feuilles de protection de paillasse plastifiées
- Pipettes répétitives

C. Matériel supplémentaire disponible chez votre distributeur Hologic :

	Cat. No.
Sonicateur *(bioMérieux réf. 39409)*	901104
Blocs chauffants (42°C ± 1°C, 60°C ± 1°C, 95°C ± 5°C)[A] *(bioMérieux réf. 39405, 39406, 39407)*	105524,105524F, 105524J
Luminomètre Leader 50i *(bioMérieux réf. 39400)*	103100i
Coffret de Réactifs de Détection *(bioMérieux réf. 39300)*	201791
Contrôles d'Amplification MTD *(bioMérieux réf.39223)*	301043F
Portoir de tubes pour le sonicateur *(bioMérieux réf. 39313)*	104027
Portoir de tubes réactionnels *(bioMérieux réf. 39311)*	104769
Pointes de pipette longues munies d'un filtre (1250 µl) *(bioMérieux réf. 39315)*	104316
Tubes en polypropylène, 12 x 75 mm *(bioMérieux réf. 39308)*	102440
Bouchons en polypropylène pour tubes de 12 x 75 mm *(bioMérieux réf. 39320)*	400713

MODE OPERATOIRE

Contrôles

Les souches utilisées comme Contrôle Positif d' Amplification doivent faire parties du complexe *M. tuberculosis*, par exemple comme souche non virulente H37Ra (ATCC 25177) ou comme souche virulente H37Rv (ATCC 27294). Les souches utilisées comme Contrôle Négatif doivent être des souches de mycobactéries non tuberculeuses (MOTT) par exemple *M. gordonae* (ATCC14470) ou *M. terrae* (ATCC 15755). Les témoins doivent être préparés avant de tester les échantillons.

Les contrôles cellulaires doivent contenir de 25 à 150 CFU par 50 µl pour atteindre une concentration finale de 1 à 10 CFU par test. Cette concentration peut être vérifiée par culture cellulaire. Ces contrôles cellulaires seront utilisés dans la préparation des Contrôles d'Amplification (voir Préparation des Echantillons).

1. Préparation recommandée des Contrôles Cellulaires :

   a. Mettre 3 à 5 billes de verre stériles de 3 mm dans un tube de culture propre.

   b. Ajouter 1-2 ml d'eau stérile. Ajouter le contenu de plusieurs öses de1 µl de la culture appropriée. Fermer le tube et l'agiter au vortex plusieurs fois à grande vitesse.

   c. Laisser reposer la suspension pendant 15 minutes.

   d. Transférer le surnageant dans un tube de culture propre. Ajuster la turbidité à 1 McFarland à l'aide d'un néphélémètre.

   e. Faire une dilution au 1/100 en mettant 100 µl de la suspension à 1 McFarland dans 10 ml d'eau stérile. Fermer et agiter à l'aide d'un Vortex. Ceci est la Dilution 1.

   f. Faire une seconde dilution au 1/100 de la suspension en mettant 100 µl de la Dilution 1 dans 10 ml d'eau stérile. Fermer et agiter à l'aide d'un Vortex. Ceci est la Dilution 2. Cette dilution doit contenir approximativement 25 à 150 CFU pour 50 µl.

   Aliquotage et conservation des Contrôles Cellulaires :

   a. Les dilutions doivent être reparties en fractions aliquotées (500 µl) à usage unique dans des tubes microfuges propres de 1.5 ml avec bouchons à vis conservés à -20°C pendant 6 mois ou à -70°C pendant un an. Ne pas utiliser de congélateur à dégivrage automatique.

   Le test avec le contrôle cellulaire positif recommandé de M. tuberculosis ne mettra en évidence seulement que les défaillances importantes des réactifs. Le contrôle positif est destiné à suivre les réactions des réactifs durant la préparation pour des interférences provenant d'un excès de NaOH ou de tampon phosphate. Le contrôle cellulaire recommandé ne détecte pas les variations de procédures concernant les temps ou les températures qui pourraient affecter l'efficacité de l'amplification ou l'adéquation du temps de la sélection. Des contrôles additionnels peuvent être testés conformément aux réglementations en vigueur ou guides de bonnes exécutions des analyses.

2. Contrôle d'inhibition des échantillons

   Lorsque le test MTD est négatif mais que le diagnostic du médecin est en faveur d'une tuberculose, il est possible de vérifier si l'échantillon contient un inhibiteur en utilisant la procédure suivante :

   a. Placer 50 µl de Tampon de Dilution des échantillons dans 2 tubes de lyse (LT) des mycobactéries (surchargé et non surchargé).

   b. Introduire 50 µl de Témoin Positif d'Amplification et 450 µl d'échantillon dans un tube (surchargé). Ajouter 450 l d'échantillon dans le second tube (non surchargé). Réaliser le test selon le protocole habituel.

Interprétation

Si le nombre de RLU (Relative Light Units) obtenu sur le luminomètre avec le tube surchargé est ≥ 30.000 RLU, l'échantillon ne contient pas d'inhibiteur de l'amplification et l'échantillon ne contient apparemment pas de cible à amplifier. Si le nombre de RLU obtenu avec le tube surchargé est < 30.000 RLU, l'échantillon contient un inhibiteur de l'amplification et un autre échantillon doit être testé. Si le test répété du tube non surchargé est positif, le résultat du test MTD peut être rendu positif. L'explication la plus plausible pour ce type de résultat est la variabilité liée à l'échantillonnage : la première prise d'essai ne contenait pas de cible à amplifier, alors que la seconde en contenait. Le nombre de RLU du tube non surchargé peut être positif ou négatif selon que la prise d'essai contient ou ne contient pas d'ARNr de mycobactérie appartenant au complexe *M. tuberculosis*.

3. Contrôle de la contamination du laboratoire

   Pour tester la contamination du laboratoire par les amplicons de *M. tuberculosis*, procéder comme suit :

   a. Mettre 1 ml d'eau stérile dans un tube propre. Humidifier un écouvillon stérile en polyester ou en dacron avec de l'eau stérile.

   b. Frotter l'écouvillon sur la paillasse ou le matériel à tester.

   c. Placer l'écouvillon dans le tube et mélanger doucement. Retirer l'écouvillon en l'essorant contre la paroi du tube. Jeter l'écouvillon dans un récipient contenant une solution d'eau de Javel diluée au 1 / 2 (moitié eau de Javel, moitié eau).

   d. Distribuer 25 µl de la solution ainsi obtenue dans un tube d'amplification contenant 50 µl de Réactif d'Amplification et 200 µl d'huile pour réaction d'amplification.

   e. Suivre les instructions du paragraphe « MODE OPERATOIRE » pour l'amplification et la détection.

   Interprétation

   Si les résultats sont ≥ 30.000 RLU, la surface testée est contaminée et doit être décontaminée par un traitement à l'eau de Javel suivant les instructions du paragraphe « MODE OPERATOIRE : Préparation du matériel ». Si l'on suspecte une contamination du bain-marie, procéder de la même façon que ci-dessus avec 25 µl de l'eau du bain-marie à condition que celle-ci ne contienne aucun produit antiseptique.

Préparation du matériel

1. L'eau du bain à ultrasons doit être dégazée avant chaque essai, afin d'optimiser le transfert d'énergie des ultrasons.

   a. Remplir le réservoir du sonicateur d'eau du robinet à température ambiante jusqu'à environ 1cm du bord.

b. Pour dégazer l'eau complètement, faire fonctionner le sonicateur pendant 15 minutes.

2. Régler un bloc chauffant à 95° ± 5°C, un bloc chauffant ou un bain-marie à 60° ± 1°C et un bloc chauffant ou un bain-marie à 42° ± 1°C.

3. Nettoyer surfaces de travail, matériel et pipettes avec une dilution 1:2 d'eau de Javel avant de commencer l'analyse. L'eau de Javel doit rester en contact pendant au moins 15 minutes. Rincer à l'eau la surface de travail pour éliminer les traces d'eau de Javel. Couvrir la surface sur laquelle le test sera réalisé avec une feuille de protection de paillasse plastifiée.

4. Préparer le luminomètre Leader. S'assurer qu'il y ait une quantité suffisante de Réactifs de Détection I et II pour réaliser les tests et s'assurer que les tubulures soient amorcées. Consulter le manuel d'utilisation du luminomètre pour les instructions de chargement des Réactifs de Détection (ces réactifs sont vendus séparément).

Préparation du réactif

Reconstituer le Réactif d'Amplification lyophilisé (A) dans son flacon (50 tests) avec 3 ml de Tampon d'Amplification (AB). Homogénéiser à l'aide d'un Vortex. Laisser le réactif reconstitué reposer à température ambiante jusqu'à ce qu'il devienne clair. Le Réactif d'Amplification reconstitué peut être conservé 2 mois à 2°C - 8°C. La solution doit être remise à température ambiante avant utilisation.

Préparation des échantillons

1. Identifier un nombre suffisant de Tubes de Lyse de Mycobactéries (LT) pour tester les échantillons et chacun des Contrôles Cellulaires d'Amplification positif et négatif ou des Témoins d'Amplification positifs et négatifs. Retirer et conserver les bouchons.

2. Distribuer 50 µl du Tampon de Dilution des Echantillons (SDB) dans tous les tubes de lyse (LT). Suivre les paragraphes ci-dessous A et B pour les contrôles et C pour les échantillons.

   A. Témoins d'Amplification des Echantillons :

      Pour chaque contrôle, ajouter 1 ml de solution CLNA/NaOH et 3 ml de tampon phosphate utilisé pour préparer les crachats avec 1 ml d'eau stérile dans le tube échantillon.

      I. Agiter pour mélanger

      II. Transférer 450 µl de solution tampon phosphate CLNA/NaOH et 50 µl de la dilution du Contrôle Cellulaire dans le Tube de Lyse identifié (LT).

   B. Si on utilise les Contrôles Cellulaires d'Amplification, transférer 450 µl du flacon de Contrôle Cellulaire d'Amplification au Tube de Lyse (LT) correspondant.

C. Echantillons : Transférer 450 µl d'échantillon, bien agité au vortex et décontaminé, de son flacon dans le Tube de Lyse (LT) identifié correspondant.

3. Reboucher les Tubes de Lyse aprés addition de chaque échantillon.

4. Agiter sous Vortex pendant 3 secondes.

Lyse des échantillons

1. Insérer les Tubes de Lyse dans le portoir du sonicateur de façon à ce que le mélange réactionnel au fond des tubes soit immergé, tout en maintenant les bouchons hors de l'eau. Mettre le portoir en place. LES TUBES NE DOIVENT EN AUCUN CAS ETRE EN CONTACT AVEC LE FOND OU LES PAROIS DU SONICATEUR.

2. Faire fonctionner le sonicateur pendant 15 minutes, mais pas plus de 20 minutes. Les échantillons et témoins ainsi traités aux ultrasons sont des «lysats». NE PAS UTILISER LE VORTEX POUR AGITER LES LYSATS.

Amplification

1. En écrivant sur le haut des tubes, identifier les tubes polypropylène pour amplification (12 x 75 mm) avec les numéros correspondant aux numéros d'identification des Tubes de Lyse (LT). Identifier également des tubes d'amplification pour les témoins d'amplification positif et négatif. Si on utilise des contrôles ARN, identifier des tubes d'amplification pour les contrôles Négatifs et Positifs.

2. Introduire 50 µl de Réactif d'Amplification reconstitué au fond de chaque tube en utilisant une pipette répétitive. Ajouter 200 µl d'huile pour réaction d'amplification (O) dans chaque tube en utilisant une pipette répétitive.

3. NE PAS UTILISER LE VORTEX POUR LES LYSATS. Transférer 25 µl de chaque lysat dans le fond du tube d'amplification correspondant en utilisant une nouvelle pointe munie d'un filtre pour chaque transfert. Les lysats restants peuvent être conservés à 2°C - 8°C pendant 7 jours, ou congelés à une température égale ou inférieure à -20°C pendant 1 mois. Ne pas utiliser de congélateur à dégivrage automatique. Si d'autres tests doivent être effectués sur les lysats, les laisser préalablement revenir à température ambiante. NE PAS UTILISER LE VORTEX POUR LES LYSATS.

4. Incuber les tubes dans un bloc chauffant à 95°C pendant 15 minutes, mais pas plus de 20 minutes.

5. Préparer la Solution Enzymatique en ajoutant 1,5 ml de Tampon de Dilution Enzymatique (EDB) au Réactif Enzymatique lyophilisé (E). Faire tournoyer pour mélanger. Ne pas agiter à l'aide d'un Vortex. Le Réactif Enzymatique reconstitué est utilisable pendant un mois à 2°C - 8°C ou pendant deux mois à une température égale ou inférieure à -20°C s'il est aliquoté et congelé[B] le jour de sa reconstitution. Si le test est effectué avec des fractions aliquotes d'enzymes congelées, les ramener

préalablement à température ambiante; ne pas décongeler les fractions aliquotes en les incubant à haute température. Pour homogénéiser les fractions aliquotes décongelées, aspirer et rejeter doucement la solution en utilisant une pipette répétitive avant de l'ajouter aux tubes d'amplification.

6. Transférer les tubes dans le bloc chauffant ou le bain-marie à 42° ± 1°C et les laisser refroidir pendant 5 minutes. NE PAS LAISSER LES TUBES ATTEINDRE LA TEMPERATURE AMBIANTE. NE PAS COUVRIR LE BAIN-MARIE.

7. Lorsque les tubes sont à 42°C, ajouter 25 µl de Réactif Enzymatique dans chaque tube en utilisant une pipette répétitive. Secouer pour mélanger. Incuber à 42°C pendant 30 minutes, mais pas plus de 60 minutes. Il faut utiliser des feuilles autocollantes ou des bouchons pendant cette étape d'incubation. NE PAS COUVRIR LE BAIN-MARIE.

8. Après la période d'incubation de 30 minutes, les tubes couverts peuvent être conservés à 2°C - 8°C pendant 2 heures ou à -20°C jusqu'au lendemain. S'ils sont stockés à -20°C jusqu'au lendemain, les tubes doivent être totalement décongelés à température ambiante ou au maximum à 60°C avant l'étape d'hybridation, et doivent être fermés avec des bouchons plutôt qu'avec des feuilles autocollantes.

Hybridation

1. Reconstituer le Réactif d'Hybridation lyophilisé (H) avec 6 ml de Tampon d'Hybridation (HB). Le Réactif d'Hybridation (H) et le Tampon d'Hybridation (HB) doivent être à température ambiante avant la reconstitution. Si le Tampon d'Hybridation (HB) a été réfrigéré, le réchauffer à 60°C en le faisant tournoyer doucement pour s'assurer que tous les composants sont solubilisés. Agiter à l'aide d'un Vortex jusqu'à ce que la solution devienne claire (cela peut prendre jusqu'à une minute) pour s'assurer que tous les composants sont solubilisés. Le Réactif d'Hybridation reconstitué est utilisable pendant un mois à 2°C - 8°C ou pendant deux mois à une température égale ou inférieure à -20°C s'il est aliquoté et congelé[C] le jour de sa reconstitution. Si le Réactif d'Hybridation reconstitué a été réfrigéré ou congelé, le réchauffer à 60°C en le faisant tournoyer doucement pour s'assurer que tous les composants sont solubilisés.

2. Ajouter 100 µl de Réactif d'Hybridation reconstitué dans chaque tube à l'aide d'une pipette répétitive. Couvrir les tubes avec des feuilles autocollantes ou des bouchons. Agiter les tubes à l'aide d'un Vortex à vitesse moyenne 3 fois pendant au moins 1 seconde[D]. Pour une bonne homogénéisation des tubes réactionnels, les maintenir en position verticale et laisser le mélange atteindre la moitié supérieure de la paroi du tube pendant l'agitation (pour éviter toute contamination ne pas laisser le mélange réactionnel entrer en contact avec les feuilles autocollantes ou les bouchons). Lorsque l'homogénéisation a été correctement effectuée, le mélange doit alors avoir une couleur jaune uniforme.

3. Incuber à 60°C pendant 15 minutes, mais pas plus de 20 minutes, dans un bloc chauffant ou un bain-marie.

Sélection

1. Le Réactif de Sélection (S) doit être à température ambiante avant de commencer le test. Retirer les tubes du bain-marie ou du bloc chauffant à 60°C et ajouter 300 µl de Réactif de Sélection (S) à l'aide d'une pipette répétitive. Couvrir les tubes avec des feuilles autocollantes ou des bouchons. Agiter à l'aide d'un Vortex, à vitesse moyenne, 3 fois pendant au moins 1 secondeD. Pour une bonne homogénéisation des tubes réactionnels, les maintenir en position verticale et laisser le mélange atteindre la moitié supérieure de la paroi du tube pendant l'agitation (pour éviter toute contamination ne pas laisser le mélange réactionnel entrer en contact avec les feuilles autocollantes ou les bouchons). Lorsque l'homogénéisation a été correctement effectuée, le mélange doit alors avoir une couleur rose uniforme.

2. Incuber à 60°C pendant 15 minutes, mais pas plus de 16 minutes, dans un bloc chauffant ou un bain-marie.

3. Retirer les tubes du bain-marie ou du bloc chauffant. Laisser les tubes revenir à température ambiante pendant au moins 5 minutes, mais pas plus d'une heure. Retirer les feuilles autocollantes ou les bouchons juste avant la phase de détection.

Détection

1. Programmer le protocole approprié sur le luminomètre. Choisir une lecture à 2 secondes.

2. Pour éliminer tout résidu de la surface des tubes, les essuyer à l'aide de papier absorbant ne peluchant pas humide, puis les introduire dans le luminomètre en suivant les instructions du manuel d'utilisation. Les tubes doivent être lus moins d'une heure après l'étape de sélection.

3. Une fois l'analyse terminée, retirer les tubes du luminomètre.

4. Après la lecture des tubes, les remplir avec précaution d'une solution d'eau de Javel diluée au 1 / 10 (un volume d'eau de Javel, 9 volumes d'eau), à l'aide d'une pissette. Laisser l'eau de Javel en contact pendant au moins une heure avant de jeter les tubes pour éviter la contamination du laboratoire par les amplicons.

5. Les portoirs de tubes doivent être décontaminés par immersion complète dans une solution d'eau de Javel diluée au 1 / 2 pendant au moins 15 minutes. Ils doivent ensuite être rincés à l'eau et essuyés, ou séchés à l'air.

6. Décontaminer le laboratoire et le matériel à l'aide d'une solution d'eau de Javel diluée au 1 / 2.

Répétition du test

1. Si le test doit être répété, laisser revenir les lysats préparés à température ambiante. NE PAS UTILISER LE VORTEX POUR LES LYSATS.

2. Suivre ensuite le mode opératoire, en commençant par l'étape d'amplification.

REMARQUES

A. Réactifs

1. Le Réactif Enzymatique ne doit pas rester à température ambiante plus de 15 minutes après avoir été reconstitué.
2. Le Tampon d'hybridation (HB) peut précipiter. Chauffer et agiter le Tampon d'Hybridation (HB) ou le Réactif d'Hybridation reconstitué à 60°C pour dissoudre le précipité.

B. Température

1. L'amplification, l'hybridation et la sélection sont des réactions thermo-dépendantes; par conséquent il est impératif de maintenir le bain-marie ou le bloc chauffant aux températures préconisées.
2. Avant l'addition du Réactif Enzymatique, laisser refroidir les tubes pendant 5 minutes afin qu'ils atteignent 42°C. Cette température permet d'obtenir des performances d'amplification optimales.
3. Le respect de la température est fondamental pour la phase d'amplification (42° ± 1°C).

C. Temps

Il est impératif de respecter les temps indiqués dans le paragraphe «MODE OPERATOIRE».

D. Bain-marie

1. Le niveau de l'eau dans le bain-marie doit être maintenu de manière à ce que le mélange réactionnel au fond des tubes soit immergé, mais à ce que l'eau ne pénètre pas dans les tubes.
2. Durant la phase d'amplification, le bain-marie ne doit pas être couvert afin d'éviter que la condensation ne tombe sur, ou dans les tubes.

E. Agitation à l'aide d'un Vortex

Il est important de disposer d'un mélange homogène lors des étapes d'hybridation et de sélection, particulièrement après l'addition du Réactif d'Hybridation (H) reconstitué (le mélange prend une couleur jaune uniforme) et du Réactif de Sélection (S) (le mélange prend une couleur rose uniforme).

L'agitation à l'aide d'un Vortex permet d'obtenir une suspension uniforme. Quand les réactifs sont placés dans un tube réactionnel et qu'ils sont exposés à une source d'énergie extérieure, il se produit une rotation rapide de la solution autour de l'axe du tube. Il en résulte une suspension uniforme. Pour que l'homogénéisation soit correctement effectuée à l'aide d'un Vortex, les tubes doivent être tenus verticalement par le haut du tube. Le liquide doit alors atteindre la moitié supérieure du tube au cours de l'agitation. Au cours des étapes d'hybridation et de sélection, cette agitation est réalisée 3 fois de suite et doit durer au moins 1 seconde chaque fois.

INTERPRETATION OU TEST

Les résultats des échantillons testés par le coffret Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) sont interprétés sur la base d'un résultat initial négatif (< 30.000 RLU), d'un résultat initial positif (≥ 500.000 RLU) ou d'un résultat initial équivoque (de 30.000 à 499.999 RLU). Le test MTD doit être répété à partir du lysat conservé lorsque le résultat initial est équivoque. Un résultat répété du lysat > 30.000 est considéré comme positif.

A. Contrôle de qualité et acceptation des résultats

Les contrôles doivent satisfaire aux valeurs suivantes :

- Contrôle Cellulaire Négatif d'Amplification : < 20.000 RLU
- Contrôle Cellulaire Positif d'Amplification : ≥ 500.000 RLU
- Témoin Négatif d'Amplification : < 20.000 RLU
- Témoin Positif d'Amplification : ≥ 1.000.000 RLU

Les résultats des tests patient ne doivent pas être reportés si les contrôles ne répondent pas aux critères ci-dessus. Se reporter au chapitre « RESOLUTION D'INCIDENTS » pour plus d'informations.

Les valeurs cibles pour les contrôles doivent être déterminées pour chaque laboratoire en fonction des résultats de chaque série de contrôles préparés.

B. Résultats des tests pour les échantillons cliniques :

Si les contrôles ne correspondent pas aux valeurs escomptées, les résultats des échantillons cliniques ne sont pas valides et ne peuvent être rendus.

Résultats :

- ≥ 500.000 RLU : positif pour l'ARNr des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*
- < 30.000 RLU : négatif pour l'ARNr des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*
- de 30.000 à 499.999 RLU : positif probable pour l'ARNr des mycobactéries du complexe *M.tuberculosis* ; test à répéter pour vérification :

  test répété ≥ 30.000 RLU : positif pour l'ARNr des mycobactérie du complexe *M.tuberculosis*.
  test répété < 30.000 RLU : : négatif pour l'ARNr des mycobactérie du complexe *M.tuberculosis*.

PRESENTATION DES RESULTATS

Les résultats des tests MTD doivent être interprétés avec l'ensemble des données cliniques et autres tests du laboratoire disponibles pour le clinicien .On peut considérer de tester d'autres échantillons en fonction du degré d'appréciation de l'état clinique.

Si le résultat initial est positif avec une RLU ≥ 500.000 ou que le test MTD répété est ≥ 30.000 RLU, alors présenter les résultats de la manière suivante :

Interprétation :	ARNr de mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* détecté. Résultat microscopique (positif ou négatif).
Information complémentaires	Culture pour la recherche de BAAR en cours. L'échantillon peut contenir à la fois des mycobactéries non tuberculeuses et *M. tuberculosis*, ou *M. tuberculosis* seul. Ce test ne doit pas être la seule base du diagnostic de tuberculose. La valeur prédictive pour un patient avec un examen microscopique négatif est inférieure à celle d'un patient avec un examen microscopique positif. Ceci est particulièrement important dans les populations testés où la prévalence de la tuberculose est faible et que les valeurs prédictives positives des méthodes de diagnostic sont réduites de façon correspondante

Si le résultat initial ou le test répété MTD est négatif (< 30.000 RLU), alors présenter les résultats de la manière suivante :

Interprétation :	ARNr de mycobactérie du complexe *M.tuberculosis* non détecté Résultat microscopique (positif ou négatif).
Information complémentaires	ARNr de mycobactérie du complexe *M.tuberculosis* non détecté. Culture pour la recherche des BAAR en attente. L'échantillon ne contient apparemment pas de mycobactéries du complexe *M.tuberculosis*, mais le résultat peut être faussement négatif du à la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon. La recherche sur un autre échantillon est recommandée si une tuberculose active est cliniquement suspectée ou si la présence d'inhibiteurs est envisagée.

LIMITES

Ce test n'est destiné qu'à la détection des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* à partir d'échantillons préparés selon les procédures NALC-NaOH ou NaOH recommandées par le CDC[7]. Ce test ne peut être utilisé qu'avec des échantillons préparés à partir de crachats (induits ou expectorés), de prélèvements bronchiques (lavages broncho-alvéolaires ou aspirations bronchiques) ou d'aspirations trachéales.

Le test MTD est spécifique des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, à savoir *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* et *M. cannetti,* mais ne différencie pas ces espèces entre elles. *M. celatum* et *M. terrae*-like peuvent provoquer des réactions croisées s'ils sont présents à des concentrations supérieures à 30 UFC par test. Toutefois, *M. celatum* et *M. terrae*-like sont rarement isolées en clinique.

La qualité des résultats du test est liée à la qualité du prélèvement et de son transport, à la variabilité de la prise d'échantillons, aux erreurs techniques du laboratoire, aux erreurs d'identification des échantillons et aux erreurs de transcription des résultats. Un test négatif n'exclut pas la présence d'une mycobactérie du complexe *M. tuberculosis* dans l'échantillon.

VALEURS ATTENDUES

A. Eventail des valeurs de contrôle relevées au cours des essais cliniques

L'évantail des valeurs obtenues pour les contrôles (RLU) lors d'essais cliniques réalisés sur 7 sites a été :

	RLU (N=704)	
	Intervalle	**Moyenne**
Témoin Positif d'Amplification	556,245 to >2,000,000	>2,000,000
Témoin Négatif d'Amplification	904 á 18,754	3,041

B. Eventail des valeurs obtenues pour les échantillons cliniques

Pour les 127 échantillons MTD-positifs, les valeurs étaient comprises entre 35.777 et > 2.000.000 RLU.

Pour les 577 échantillons MTD-négatifs, les valeurs étaient comprises entre 573 et 19.176 RLU.

L'occurrence des résultats en RLU pour tous ces échantillons, après résolution des discordances, figure cidessous : la résolution des discordances est basée sur l'analyse d'autres échantillons, positifs en culture, provenant d'un même patient et/ou sur le diagnostic final du médecin traitant.

PERFORMANCES

A. Evaluation clinique

Les performances du test MTD dans sa forme originale ont été évaluées au cours d'essais cliniques réalisés dans six laboratoires en comparant les résultats obtenus par examen de frottis aux résultats de la culture, sur 6.079 échantillons provenant de 2.609 patients. Parmi ceux-ci, 4.000 échantillons provenaient de 1.898 patients ne recevant pas de traitement anti-tuberculeux. Les six sites représentaient des zones géographiques différentes : cinq centres hospitaliers de grandes villes américaines, possédant un service spécialisé pour la tuberculose, et un laboratoire public.

Les performances du test MTD dans sa forme actuelle ont été évaluées sur sept sites, en comparant les résultats du test MTD aux résultats de la culture. Les sept centres participant au test représentaient des zones géographiques différentes : six centres hospitaliers de grandes villes américaines, possédant un service spécialisé pour la tuberculose, et un laboratoire public national de mycobactériologie. Les échantillons testés provenaient de patients ne recevant pas de traitement anti-tuberculeux. 132 ont donné des résultats positifs en culture pour les mycobactéries du complexe *M.*

tuberculosis. MTD a détecté 119 de ces échantillons culture-positifs; 7 échantillons contenaient des mycobactéries non tuberculeuses en plus de *M. tuberculosis*.

ÉCHANTILLONS
PROVENANT DE PATIENTS NON TRAITES
Comparaison MTD / culture (N=704)

PAR PATIENT (avant résolution des discordances) Culture	+	–
MTD +	54	4
MTD –	4	221

PAR PATIENT (avant résolution des discordances) Culture	+	–
MTD +	56	2
MTD –	4	221

PAR ÉCHANTILLON (avant résolution des discordances) Culture	+	–
MTD +	119	8
MTD –	13	564

PAR ÉCHANTILLON (avant résolution des discordances) Culture	+	–
MTD +	125	2
MTD –	13	564

Les patients suspectés d'être atteints d'une tuberculose pulmonaire active et n'étant pas sous traitement ont été inclus dans cette étude. La prévalence totale des patients ayant eu une culture positive pour *M. tuberculosis* était de 20,5%.

Par patient, une sensibilité moyenne de 93,3% et une spécificité moyenne de 99,1% ont été déterminées, par rapport à la culture. Par échantillon, une sensibilité moyenne de 90,6% et une spécificité moyenne de 99,6% ont été déterminées, par rapport à la culture. Le tableau ci-dessous donne la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN), avec des intervalles de confiance de 95%, pour les estimations de performances. Toutes les données affichées sont présentées après résolution des discordances basée sur l'analyse d'autres échantillons, positifs en culture, provenant du même patient etIou sur le diagnostic final du médecin traitant.

Par patient:

	Pourcentage moyen	**Nombre/ Total**	**Intervalle de confiance de 95%**
Sensibilité	93.3%	56/60	83.8 – 98.2%
Spécificité	99.1%	221/223	96.8 – 99.9%
VPP	96.6%	56/58	88.1 – 99.6%
VPN	98.2%	221/225	95.5 – 99.5%

Par échantillon :

	Pourcentage moyen	Nombre/ Total	Intervalle de confiance de 95%
Sensibilité	90.6%	125/138	84.4 – 94.9%
Spécificité	99.6%	564/566	98.7 – 100%
VPP	98.4%	125/127	94.4 – 99.8%
VPN	97.7%	564/577	96.2 – 98.8%

Sur les 564 échantillons négatifs en culture et MTD-négatifs pour les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, 114 échantillons contenaient des mycobactéries atypiques, mises en évidence par culture, 64 provenaient de patients dont d'autres échantillons ont permis d'isoler des mycobactéries atypiques par culture et 169 provenaient de patients dont aucune mycobactérie n'a été isolée en culture.

B. Précision

Des panels d'échantillons, consistant en 2 échantillons négatifs, 2 échantillons faiblement positifs ([a]100 UFC/test) et 2 échantillons modérément positifs ([a]1000 UFC/test) ont été testés sur trois sites. Les échantillons positifs on été préparés en ajoutant des quantités connues de *M. tuberculosis* à un pool d'échantillons modérément inhibiteurs. Les échantillons ainsi que des témoins d'amplification positif et négatif ont été testés en triple deux fois par jour, pendant 3 jours sur les trois sites.

La variabilité des résultats n'étant pas significative d'un site à l'autre ou d'un jour à l'autre, les résultats des trois sites ont pu être consolidés et sont présentés ci-dessous. Les valeurs de lecture mesurées en RLU sont limitées par la résolution du tube photomultiplicateur du luminomètre. Pour cette raison, les valeurs supérieures à 2.000.000 RLU sont ramenées à 2.000.000 RLU. Ni les écarts-types, ni les coefficients de variation ne sont indiqués.

	Précision			
	Nombre d'observations	**% de résultats corrects**	**Plage (RLU)**	**Moyenne (RLU)**
Échantillons 1 : Forts positifs	108	100%	154,103 - >2,000,000	>2,000,000
Échantillons 2 : Faibles positif	108	99.1%	16,324 - >2,000,000*	>2,000,000
Échantillons 3 : Négatifs	108	100%	2,004 - 5,693	2,689
Témoin positif	54	100%	>2,000,000	>2,000,000
Témoin négatif	54	100%	2,272 - 4,241	2,944

*Un résultat négatif observé.

C. Reproductibilité

L'étude de reproductibilité a été effectuée en testant 25 échantillons, des témoins d'amplification négatifs étant intercalés entre chaque échantillon, pour former un total de 50 échantillons. Le panel de reproductibilité a été testé sur quatre sites.

Au total, 100 % (120/120) des échantillons négatifs et 98,8 % (79/80) des échantillons positifs ont donné les résultats attendus.

D. Spécificité analytique

La spécificité du test MTD a été évaluée à l'aide de bactéries, de champignons et de virus. Dans le cas des bactéries et des champignons, les tests de spécificité ont porté sur 160 souches (151 espèces provenant de 62 genres) de mycobactéries très proches de *M. tuberculosis*, d'autres microorganismes responsables de maladies respiratoires, et d'un panel phylogénétique de microorganismes de la flore commensale de l'appareil respiratoire. Les souches types étaient des cultures ATCC (American Type Culture Collection), et 5 souches avaient été fournies par des laboratoires d'analyses. Les lysats, préparés à partir de cultures en phase active de croissance (ou d'ARNr, dans trois cas) ont été analysés selon le protocole du test MTD, à environ 5×10^7 UFC par test. Seules les souches du complexe *M. tuberculosis* ont donné des résultats positifs, à l'exception de souches de *M. celatum* et *M. terrae*-like.

A des concentrations supérieures à 30 UFC par test, les souches de *M. celatum* et certaines souches *M. terrae*-like ont donné des résultats positifs (26.772 RLU pour *M. celatum* et de 19.470 à 49.976 RLU pour *M. terrae*-like).

E. Limite de détection

Trente souches de *M. tuberculosis* provenant de régions géographiques très variées, y compris des représentants de souches résistantes et de souches sensibles aux antibiotiques, ont été détectées par le test MTD. Le test MTD a pu détecter jusqu'à 1 UFC par test de chacune des 30 souches.

F. Test de surcharge

De l'ARNr de *Mycobacterium tuberculosis* à une concentration de 25 fg (équivalant à 5 UFC par test) ont été testés en présence d'environ 540.000 UFC par test (450 µl) des organismes non cibles suivants : *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Legionella pneumophila, Pseudomonas aeruginosa, Mycobacterium gordonae, M. avium, M. kansasii*, *M. terrae*, *Nocardia asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae*, *Gordona sputi* et *Rhodococcus bronchialis*. Tous les résultats ont été positifs pour l'ARNr de *M. tuberculosis* en présence de ces organismes non-cibles, qui n'ont donc pas créé d'interférence.

RESOLUTION D'INCIDENTS

OBSERVATION	CAUSES POSSIBLES	RECOMMANDATIONS
Valeurs élevées pour les Contrôles Cellulaires Négatifs d'Amplification ou les Contrôles Négatifs d'Amplification. (≥ 20.000 RLU)	Homogénéisation insuffisante après ajout du Réactif de Sélection (S) ou trop faible volume de Réactif de Sélection.	Ré-homogénéiser correctement. Veiller à respecter les volumes indiqués. Vérifier l'apparition d'une solution de couleur rose uniforme après l'agitation.
	Amplification de contaminants introduits par manque de précaution au cours de la préparation des réactions.	Un grand soin doit être apporté à la distribution des réactifs à l'aide des pipettes. Les tubes usagés doivent être décontaminés avec une solution d'eau de Javel diluée au 1 / 10, comme indiqué dans le paragraphe « MODE OPERATOIRE ». Les paillasses, blocs chauffants, bains-marie et pipettes doivent être décontaminés avec une solution d'eau de Javel diluée au 1 / 2 comme indiqué dans le paragraphe « MODE OPERATOIRE ».
	Omission de l'étape de refroidissement de 5 minutes.	
	Contamination du laboratoire ou des réactifs.	
	Omission de l'essuyage des tubes avant lecture à l'aide du luminomètre.	
	Non respect des températures préconisées lors de l'étape d'amplification.	Les tubes doivent être essuyés avec du papier absorbant ne peluchant pas humide avant lecture à l'aide du luminomètre.
Valeurs faibles pour les Contrôles Cellulaires Positifs d'Amplification ou les Contrôles Positifs d'Amplification (< 500.000 RLU)	Ajout du Réactif d'Amplification en versant le liquide sur les parois du tube et non directement au fond du tube.	Vérifier la température du bain-marie et/ou du bloc chauffant et l'ajuster si nécessaire pour respecter les températures préconisées.
	Homogénéisation insuffisante après ajout du Réactif d'Hybridation reconstitué.	Agiter soigneusement à l'aide du Vortex, comme spécifié (voir le paragraphe « Hybridation / 2 »). Vérifier la formation d'une solution de couleur jaune uniforme après agitation.
	Volume de Réactif de Sélection trop important.	Vérifier le réglage de volume sur la pipette.
	Non respect du temps préconisé pour l'étape de sélection.	Respecter les 15 minutes d'incubation à 60°C, au cours de l'étape de Sélection.

OBSERVATION	CAUSES POSSIBLES	RECOMMANDATIONS
	La température des tubes est descendue en dessous de 42°C après l'incubation à 95°C.	Transférer directement les tubes du bloc chauffant à 95°C au bain-marie / bloc chauffant à 42°C.
	Les tubulures amenant le Réactif de Détection sont bouchés.	Rincer les tubulures à l'eau chaude comme indiqué dans le manuel d'utilisation de l'instrument.

NOTES

A. Les blocs chauffants doivent avoir des puits prévus pour les tubes 12 x 75 mm. L'utilisation des blocs chauffants est recommandée.

B. Il est recommandé d'utiliser des tubes microfuges munis d'un bouchon à vis pour conserver les fractions aliquotes congelées. Les fractions aliquotées ne peuvent être congelées et décongelées qu'une seule fois. NE PAS utiliser de congélateurs à dégivrage automatique.

C. Pour le stockage des fractions aliquotes congelées, il est recommandé d'utiliser des flacons pour réfrigération de 5 ml. Les fractions aliquotes congelées ne peuvent être décongelées qu'une seule fois. Ne pas utiliser de congélateur à dégivrage automatique.

D. Les performances des VORTEX pouvant différer selon le matériel utilisé, il peut être nécessaire d'adapter le temps d'agitation. Régler la vitesse de l'appareil et suivre les instructions du « REMARQUES, paragraphe E », pour permettre au mélange réactionnel d'atteindre la moitié supérieure de la paroi du tube. Une bonne homogénéisation est indispensable à l'obtention de résultats précis. Les temps d'agitation peuvent être portés à 15 secondes sans affecter les résultats.

BIBLIOGRAPHIE

1. Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association, 1983. *Levels of laboratory services for mycobacterial diseases*. Am. Rev. Respir. Dis. **128**:213.

2. **Arnold, L.J., P.W. Hammond, W.A. Wiese, and N.C. Nelson,** 1989. Assay formats involving acridinuim-ester-labeled DNA probes. Clin. Chem. **35**:1588-1594.

3. **Bradley, S.T, S.L. Reed and A. Catanzaro**, 1996. Clinical Efficacy of the Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **153**:1606-1610.

4. Centers for Disease Control, 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.

5. Centers for Disease Control and Prevention, and National Institute of Health. May, 1993. 3rd Edition. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. pp. 93-96.

6. **Collins, F. M**., 1989. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. Clin. Microbiol. Rev. **2**: 360-377.

7. **Kent, P.T. and G.P. Kubica**, 1985. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.

8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control: Principles and definitions; Approved Guideline. NCCLS document C24-A. Villanova, PA: NCCLS; 1991.

9. **Pitchenik, A.E., D. Fertel, and A.B. Block**, 1988. *Mycobacterial Disease: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention.* Clin. Chest Med. **9**:425-441.

10. **Roberts, G.D., E.W. Koneman, and Y.K. Kim**, 1991. Mycobacterium, pp. 304-339. In A. Balows, et al. (eds.), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

11. **Simone, P.M. and Iseman, M.D**., 1992. Drug-resistant Tuberculosis: A Deadly and Growing Danger. J. Resp. Dis. **13**:960-971.

12. **Wayne, L.G**., 1982. Microbiology of the tubercle bacilli. Am. Rev. Respir. Dis. **125** (3 pt 2):31-41.

13. **Van Soolingen, D**., et al. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Intl. J. Syst. Bacteriol. **47**:1236-1245.

14. **Kerleguer A., Koeck J. L., Fabre M., Gérôme P., Teyssou R., Hervé** V., 2002. Application of a Grey-Zone for the Interpretation of The "Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Rapid Diagnosis of Respiratory Tuberculosis." Esm May 2002.

15. **Coll P**, **Garrigó M., Moreno C., Marti N.,** 2002. "Routine Use of E-MTD (Hologic) For Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples." Esm 2002.

Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA

Service clients : +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com

Service technique : +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Pour obtenir des coordonnées supplémentaires, visitez le site www.hologic.com.

Hologic et Amplified MTD sont des marques commerciales et/ou des marques déposées d'Hologic, Inc. et/ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

Toutes les autres marques commerciales qui peuvent apparaître dans ce notice sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

EC REP

Authorized Representative
EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands

AW-12601-901 Rev. 001 (FR)
©1995 - 2015 Hologic, Inc. Tous droits réservés.
2015-03